高效能植酸酵素對土壤有機磷有效性增進及有機質肥料品質影響之評估

張明暉[1]、楊秋忠[2]

[1]行政院農業委員會農業試驗所
[2]國立中興大學土壤環境科學系

摘 要

土壤有機磷約佔全磷量30-50%，植酸是主要成分，約佔土壤有機磷10-50%，爲達農業永續生產，如何增進土壤有機磷有效性有其重要性。唯植酸須賴植酸酵素水解作用，方能釋出無機磷供作物吸收利用。鑑於近年來利用基因工程生產高效能植酸酵素作爲動物飼料之可行性及從文獻報告得知植酸酵素確實可以增加盆栽無機磷濃度及玉米植株乾物重，故利用高效能植酸酵素應可增進酸、中性土壤中有機磷之有效性。

由於豬、家禽無法利用飼料中之植酸，必須在飼料中添加額外無機磷，因而往往造成環境中植酸磷污染，故近年來世界各國相繼研發高效能植酸酵素作爲飼料添加物，而目前己有商品化產品，唯本省畜牧業受限於價格考量，該種酵素在豬、家禽飼料添加上仍未普遍，故此類動物排泄物中當仍含有極豐富植酸，除此，米糠亦含豐富植酸。因此應用基因改良耐熱菌株產生之高效能植酸酵素，應可促進植酸水解，增進磷素有效性，適用於高磷有機質肥料生產。

另外，在飼料中添加基因工程產生之高效能植酸酵素及以低植酸含量玉米作爲飼料，均可有效減少動物排泄物造成環境中磷污染，因此日後以此類動物排泄物生產之有機質肥料，可改善目前因有機質肥料施用量依氮素需求估算所造成土壤磷過高的問題，因此，我們期能提升有機質肥料品質及多元化，使得有機質肥料製造及應用更臻完善。

關鍵詞：土壤、植酸、植酸酵素、有機質肥料

前　言

植酸(phytate)爲穀類及豆科作物植株中磷素主要貯藏形式，約佔全磷量 65%，此類作物爲人類及動物主要營養素，唯植酸無法爲缺乏植酸酵素(phytase)之單胃動物分解，如豬、家禽、魚類無法代謝植酸，致使必須另外添加無機磷於飼料中以滿足所需，結果密集式畜牧業往往造成環境中磷污染；另植酸易束縛鈣、鎂、鐵、錳、銅、鉬、鋅以及蛋白質，爲抗營養劑，因此以植酸酵素作爲動物飼料添加物，可以提高動物對飼料中植酸鹽利用率及減少環境中磷污染。而目前植酸酵素已有商品化產品上市，唯售價仍高達每公斤 900-1000 元。

根據文獻指出土壤有機磷約佔全磷量 30-50%，甚至高達 80%，其主要爲植酸，約佔土壤有機磷 10-50%；而利用本省農牧廢棄物生產有機質肥料之原始材料來源眾多，其中豬、家禽糞便以及米糠含豐富植酸，如雞糞植酸鹽含量約 1,610-3,510 $\mu g\ g^{-1}$，米糠約 60,000 $\mu g\ g^{-1}$。而植酸必需藉由植酸酵素水解作用，方能釋出無機磷供作物吸收利用。鑑於近年來利用基因選殖操作技術生產高效能植酸酵素作爲動物飼料添加物之可行性，本文擬就高效能植酸酵素應用在土壤有機磷有效性增進及有機質肥料品質提升作一探討、評估，以爲日後生物肥料及有機質肥料多元化之利用參考。

植酸酵素之回顧介紹

1907 年 Suzuki 等人首次在米糠中發現植酸酵素(phytase 或 myo-inositol-hexaphosphate phosphohydrolase)，1962 年美國 International Minerals and Chemicals (IMC) 開始著手研發植酸酵素商品化產品，其後至 1979 年代雖陸續分離發現優良菌株，如 *Aspergillus niger* NRRL 3135 syn *A. ficuum* 。而直至目前基因選殖操作之植酸酵素基因有兩個，大多分離自該種菌株，分別爲 *phyA* 和 *phyB*，其酵素活性最適合之酸鹼值，*phyA* 爲 pH 2.5 和 5.0，*phyB* 爲 pH 2.0-pH 2.5。1971 年 Nelson 等人曾以植酸酵素爲飼料添加物，可惜植酸酵素產量不高，不符經濟原則。直至 1980 年代，隨著基因選殖操作許可，產量明顯增加。荷蘭 Gist-brocades 和芬蘭 Alko Ltd 同時於 1987 年投入商品化植酸酵素研發。1991 年，Gist-brocades

選殖 *phyA*，並結合 amyloglucosidase 啓動子於 *A. niger* NRRL 3135，酵素產量比原野生種增加約 52 倍，目前該商品化植酸酵素已廣泛使用於家禽、豬之飼料添加物，且在許多國家核准上市(包括台灣)，而美國亦於 1996 年一月核准植酸酵素爲食品添加物上市。

含植酸之有機磷可經由植酸酵素水解作用，釋出無機磷以供植物吸收利用，其構造及反應式如圖一所示。植酸爲穀類及豆科作物植株中磷素主要貯藏形式，如表一所示，約佔全磷量 65% (Jongbloed et al., 1990)。此類作物爲人類及動物主要營養素，唯單胃動物缺乏磷酸酵素，如豬、家禽、魚類無法代謝植酸，致使必須另外添加無機磷於飼料中以滿足所需，結果往往造成密集式畜牧業環境中磷污染；另植酸易束縛鈣、鎂、鐵、錳、銅、鉬、鋅以及蛋白質，爲抗營養劑(Janne kerovuo et al., 1998)，因此以植酸酵素作爲動物飼料添加物，可以提高動物對有機磷利用率及減少環境中磷污染。根據美國農部 1993 年統計估算，美國地區飼養之單胃動物，每年若於飼料中添加植酸酵素，則由植酸鹽水解釋出的磷素約 $1.68*10^8$ 美元，如表二所示。除此，可以減少 $8.23*10^7$ kg 磷素排放至環境中，如表三所示。

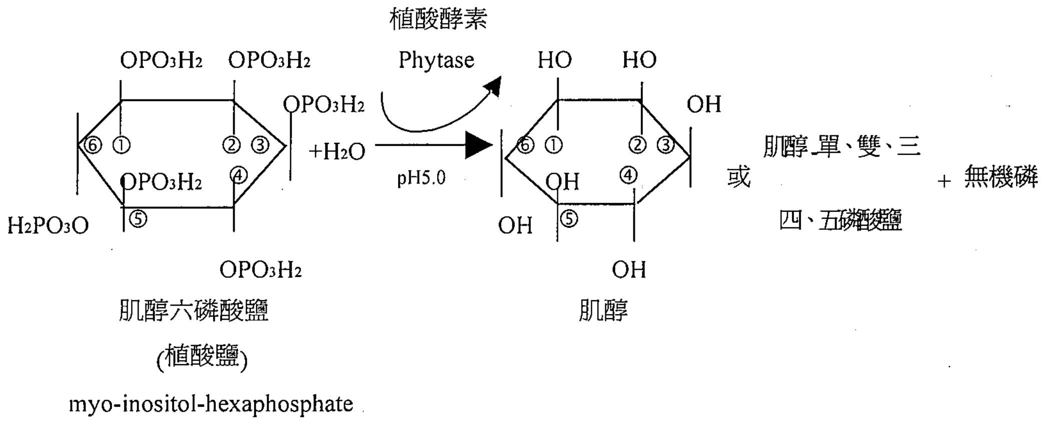


圖 1. 植酸鹽經由植酸酵素之水解反應
Source:Bing-Lan Liu, 1998

表一、植物中植酸的含量

植體	植酸含量 (% W/W)
Waldron wheat (小麥)	1.1
Waldron wheat bran (麥麩)	4.8
Wheat germ (麥胚芽)	3.9
Corn (玉米)	0.9
Corn bran (玉米麩)	0
Corn germ (玉米胚芽)	6.4
Soy beans (大豆)	0.4
Soy flasks (大豆片)	0.8
Dehulled seame seeds (脫脂胡麻)	0.1
Peanuts (花生)	5.3
Dehydrated peas (脫水豌豆)	0.9
Lima beans (扁豆)	0.9
Barley (大麥)	2.5
Oats (燕麥)	0.0
Wild rice (稻米)	0.8
Sunflower seeds (向日葵)	1.9

資料取自 蔣正華，1996

表二、動物飼料中添加植酸酵素於市場價值之預估

動物	飼養數目 (美國, 1992)[a]	平均重量 (kg/隻)	餵食飼料量 (kg/隻)	飼料植酸磷濃度 (%)	每隻動物植酸利用量(kg/隻)	每年植酸磷水解量 (kg/年)	植酸中磷之總價 ($)
肉雞	6.14×10^9	2.01	3.8	0.21	0.008	4.91×10^7	6.75×10^7
蛋雞	3.64×10^8		36.4/年	0.18	0.066	2.40×10^7	3.32×10^7
鴨	1.80×10^7	2.95	7.08	0.21	0.015	2.70×10^5	3.70×10^5
火雞	2.89×10^8	9.91	26.4	0.21	0.055	1.59×10^7	2.19×10^7
豬	5.78×10^7	80.4	265	0.21	0.56	3.24×10^7	4.44×10^7
總計						1.22×10^8[b]	1.68×10^8

a. National Agricultural Statistics 1993.

b. 134,082 Tons.

Source:Rudy J. Wodzinski and A. H. J. Ullah, 1996

表三、動物飼料中添加植酸酵素對磷污染減少之影響

動物	飼養數目(美國, 1992)[a]	平均重量(kg/隻)	餵食飼料量(kg/隻)	每隻動物排泄物中磷含量(g) 飼料中添加無機磷	飼料中添加植酸酵素	每年排泄物中磷減少量(kg)
肉雞	6.14×10^{9}	2.01	3.8	14.5	8.4	3.75×10^{7}
蛋雞	3.64×10^{8}		36.4/年	139/年	80.5/年	2.20×10^{7}
鴨	1.80×10^{7}	2.95	7.08	27(估計)	15.6(估計)	2.81×10^{5}
火雞	2.89×10^{8}	9.91	26.4	101(估計)	58.5(估計)	1.69×10^{7}
豬	5.78×10^{7}	80.4	265	271(估計)	177	5.62×10^{6}
總計						8.23×10^{7}[b]

a. National Agricultural Statistics 1993.

b. 90,000 Tons.

Note. 134,082 of P=total value of $ 1.68×10^{8}

Source:Rudy J. Wodzinski and A. H. J. Ullah, 1996

植酸酵素的來源如表四所示，(1).植物性來源：穀類、豆科以及某些種子及花粉富含該酵素。(2).動物性來源：該酵素存在脊椎動物紅血球及血漿中以及哺乳動物小腸中。(3).微生物：可分爲細菌與真菌，細菌諸如 *Aerobacter aerogenes* (Greaves et al.,1967)，*Bacillus subtilis* (Shimizu,1992)，*Pseudomonas* sp.(Cosgrove,1970)；真菌如 *Aspergillus spp.* (Ullah and Gibson,1987)以及酵母菌(Greenwood and Lewis, 1977)。一般由真菌產生之植酸酵素爲胞外酵素，而由細菌產生者，除了 *Bacillus subtilis* 和 *Enterobacter* 爲胞外酵素，一般爲胞內酵素(Liu et al., 1998)。植酸酵素依其來源及作用方式，可區分爲 3-phytase(EC 3.1.3.8)和 6-phytase(EC 3.1.3.26)兩種，前者源自微生物，後者源自植物。 植物雖亦可生產植酸酵素，目前亦有轉基因植物作爲飼料添加物，但費時且不易量產，故一般以微生物來生產(曾，1998)。一般，植酸酵素最適酸鹼值爲 pH 4.5-6.0，最適溫度爲 45-60℃。而目前商品化產品均不耐熱，爲日後研究重點。

表四、植酸酵素之來源與特性

種類	來源	分子量(kDa)	適當溫度(℃)	適當 pH
細菌	*B. subtilis*	36-38	60	6.0-6.5(6.25)
	E. coli	42	55	4.5
	Enterobacter	-	50	7.0-7.5
	K. aerogenes	10-13,700	60-70	4.5,5.2(3.7)
	Pseudomonas	-	-	5.5
真菌	*A. ficuum*	85-100	55-60	4-6(4.5)
	A. niger	200	53	5.5
	A. terreus	214	70	4.5
	A. oryzae	120-140	50	5.5(4.5)
	R. oligosporus	-	55	4.5
酵母菌	*S. casterllii*	490	77	4.4
	Bakers' yeast	-	45	4.6
植物	油菜籽	-	50	5.2
	南瓜	66.5	48	4.8
	麝香百合	88	55	8.0
	玉米	76	55	4.8
	綠豆	160	57	7.5
	大豆	60	55	4.5-4.8(5.5)
	小麥	68	45	6.0
	麥麩	47	55	5.0-5.6,7.0
動物(腸黏液)	人類	-	-	7.4
	雞	-	-	8.2
	小牛	-	-	8.7
	老鼠	70-90	-	7.0,7.5-7.8

Source：Bing-Lan Liu et al., 1998

土壤有機磷之性質

土壤有機磷含量約佔全磷量 30-50% (Paul and Clark, 1989)，甚至高達 80% 。土壤有機磷含量明顯受母岩影響，一般石灰性土壤、沖積土以及湖中黏土含量低，而玄武岩、火山灰、鹼性火成岩較高；而黏土之有機磷含量高於粗質地土壤，但較腐植質土壤低；另有機磷多以大分子化合物存在，主要與黃酸(fulvic acids)結合，其次與腐植酸(fumic acids)，而腐植素(humins)幾乎不含磷素。Walker and Adams(1959)研究結果顯示：有機磷含量隨降雨量及平均溫度增加而減少。其他影響土壤有機磷含量之因子包括：排水、土壤酸鹼度、耕犁情形等。排水不良土壤，有機磷含量較少；土壤有機磷含量一般隨土壤酸鹼度減少而增加，隨耕犁操作而減少。

土壤有機磷一般區分爲三大類，即肌醇磷酸鹽(inositol phosphates)、磷脂質(phospholipids)、核酸(nucleic acids)，如表五所示，其主要爲肌醇磷酸鹽，該分子可能與碳水化合物或蛋白質形成複合物，主構造可能含有六、五、四、三、二個磷酸，依植酸酵素水解程度而定，而土壤中以含有六、五個磷酸佔大多數，其它較低分子者很少。其中含有六個磷酸之肌醇磷酸鹽即植酸(phytate 或 phytic acid 或 myo-inositol hexaphosphate)，其若含有鈣-鎂則通稱爲植酸鈣鎂(phytin)。植酸爲主要之土壤有機磷，約佔 10-50% (Alexander, 1977)。植酸鹽爲磷酸酯化合物，主要爲正磷酸單酯。且長期試驗施用過磷酸鈣，土壤有機磷多以正磷酸單酯聚積(Condron et al., 1985)。

表五、土壤有機磷種類之分佈比例

土壤來源	有機磷%		
	肌醇磷酸鹽	磷脂質	核酸
澳洲	0.4-38	-	-
孟加拉	9-83	0.5-7.0	0.2-2.3
英國	24-58	0.6-0.9	0.6-2.4
加拿大	11-23	0.9-2.2	-
紐西蘭	5-43	0.7-3.1	-
奈及利亞	23-30	-	-
美國	3-52	-	0.2-1.8

Source ： Dalal, 1977

利用基因工程改良菌株分泌之植酸酵素增進土壤有機磷之有效性

磷爲肥料三要素，爲農業作物生產之必需營養素，其來自礦石開採，終有用盡耗竭之日，故爲達農業永續性，如何增進土壤磷有效性有其重要性。耕作土壤雖經長年大量施磷肥，但多爲土壤固定累積，致使土壤中磷之有效性甚低，不易被作物吸收利用。一般磷肥施入一年生作物土壤，回收之磷素不超過 20%(楊，1993)，此被土壤固定的磷素就如同存放在銀行的貨幣，若未經提領使用，即無法發揮效用。而土壤有機磷有效性之增進有賴磷酸酵素(phosphatase)水解作用釋出

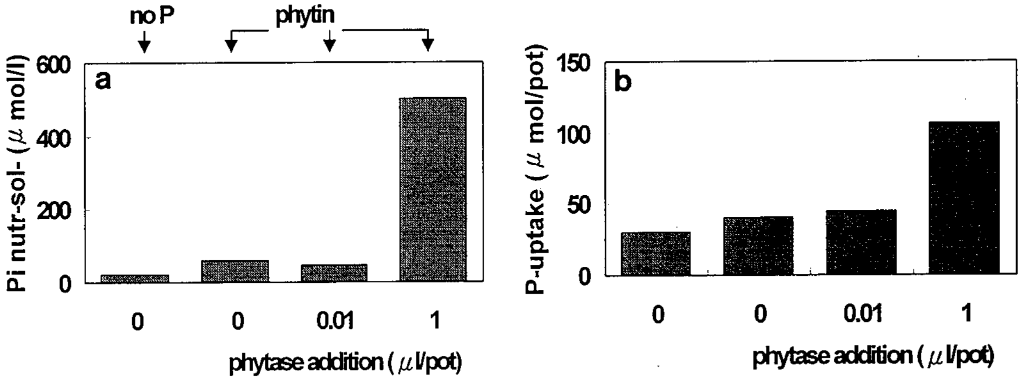
無機磷以供植物利用。一般凡能催化磷酸酯水解反應之酵素通稱爲磷酸酵素，文中提及之「植酸酵素」係磷酸酵素的一種，其名稱係根據酵素對基質專一性之特性。

台灣土壤中究竟含有多少有機磷？根據馬氏 1978 分析資料，一般土壤無機磷含量高於有機磷，但部分酸性土壤有機磷含量高於無機磷，且一般酸性土壤有機磷含量高於石灰性土壤，如表六所示。而穀類、豆科作物廣佈於世界各地，提供人類及動物養分主要來源，植酸爲其重要儲存形態，若能利用植酸酵素將其水解出無機磷，必能增加土壤磷素地力進而達永續利用之目的；至今，關於植酸酵素對土壤磷有效性之文獻不多，1993 年 Günter 等人曾於砂耕盆栽試驗觀測添加不同濃度（0，0.01，1 µl/pot）植酸酵素對植酸鈣鎂（2 mM phytin）磷有效性之影響，結果顯示：經過 20 天生育期，添加 1µl 植酸酵素，確可增加無機磷濃度約 10 倍左右（如圖 2. a)，且植株對磷吸收增加 2.5 倍（如圖 2.b)，以及植株乾物重增加 32% （如圖 2.c)，除此，作者繼而以 3 種不同低磷土壤(Heide, Loess, Nhasamba)進行盆栽試驗，每盆植酸鈣鎂（phytin）磷施用量分別爲 0，320，1000 和 3200 µmol，植酸酵素 0，1 或 10 µl，結果如圖 3 所示：若未施用植酸酵素，植株乾物重變化不明顯。且由變方分析得知植酸鈣鎂和植酸酵素之之添加確實會影響植株乾物重。除此，1997 年 Richardson 等人從土壤篩選獲得之螢光性 *Pseudomonas spp* (*P. mendocina* CCAR31 和 CCAR60)具分泌植酸酵素的能力，且其從植酸釋出之無機磷高達 81%。今台灣耕地土壤以酸、中性佔大多數，而植酸酵素最適酸鹼値爲 pH 4.5-6.0，故應用於酸、中性土壤應較適宜。而近日隨著分子生物學基因調控操作技術之進步，以基因工程菌株生產高效能植酸酵素，增進酸、中性土壤有機磷之有效性當爲可行。

表六、 台灣地區土壤有機磷、無機磷含量

土壤	土系	土類	有機磷	無機磷	植生
			------μg g^{-1}-------		
1	龍崗系	紅壤	181	361	水稻
2	龜山系	紅壤	88	75	水稻
3	平鎮系	紅壤	139	100	茶樹
4	陳厝寮系	紅壤	117	161	甘蔗
5	老埤系	紅壤	365	273	鳳梨
6	淡水系	紅壤	232	144	芒草
7	二林系	粘板岩老沖積土	117	631	水稻
8	二水系	粘板岩老沖積土	120	948	水稻
9	善化系	台灣粘土	115	493	水稻
10	麻豆系	砂頁岩新沖積土	110	752	甘蔗
11	座駕系	砂頁岩非石灰性新沖積土	126	257	水稻
12	花壇系	粘板岩新沖積土	220	583	水稻
13	五魁寮系	粘板岩老沖積土	218	423	蓮霧、檳榔

資料整理自馬清華，1978



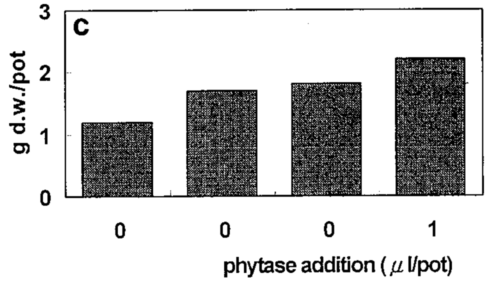


圖 2.(a)砂耕 Pi 濃度 (b)盆栽玉米對磷之吸收量(c)玉米乾物重

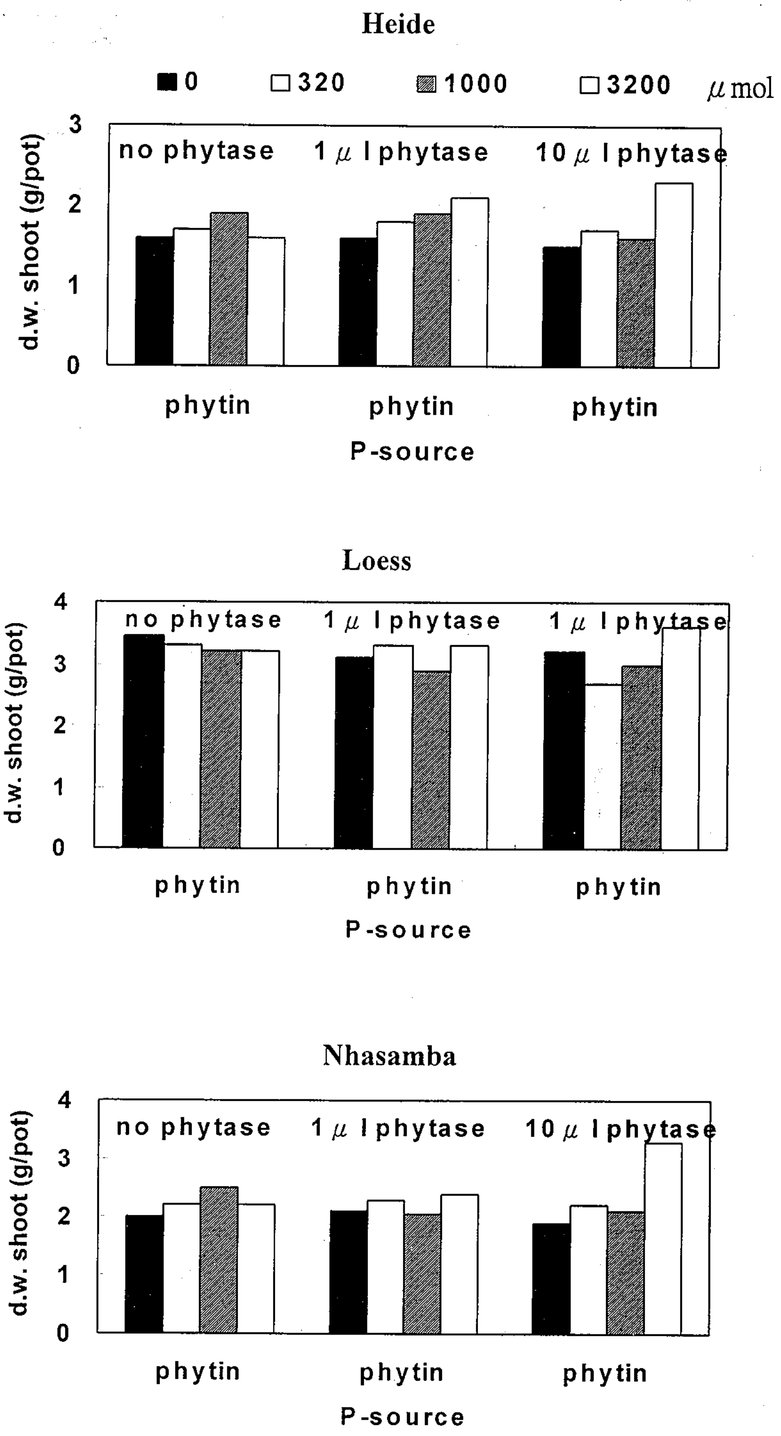


圖 3.三種不同土壤，植酸鈣鎂添加植酸酵素之後，
對玉米地上部乾物重之影響

基因工程應用於有機質肥料品質提升之探討

近年來基因工程改良菌株生產高效能植酸酵素作爲飼料添加物，在植酸水解成無機磷反應上，可謂神奇的（Novel）、不可思議的（Fabulous），今日，本省畜牧業者受限於經濟考量，該酵素在豬、家禽飼料添加應用上仍未普遍，故此類動物排泄物中當含有極豐富之植酸及部分未被消化吸收之無機磷，如雞糞植酸含量約 1,610-3,510 μg g^{-1}(Peperzak et al., 1959)；另米糠亦含有豐富植酸約 60,000 μg g^{-1}(Azhar et al., 1998)。因此以這些廢棄物作爲有機質肥料生產資材，在堆積腐熟過程中接種基因工程改良耐熱菌株生產之高效能植酸酵素，應可促進其植酸鹽水解，增進磷素有效性，適用於生產高磷有機質肥料。唯此方法生產之有機質肥料可能不適用於密集式栽培模式，蓋目前有機質肥料施用量多依氮素需求估算，長期施用結果恐有土壤磷素過高之虞，如本省某些蔬菜專業區溫網室栽培，年期作數達 9-10 作，土壤磷素過高、養分不平衡，可能造成土壤有效性鐵、鈣降低，作物發生缺鐵、缺鈣現象。雖然土壤對磷素具有很強固定能力，但當磷素濃度超過土壤吸附容量時，多餘的磷素仍會隨灌溉水逕流或淋洗至河川、湖泊，造成優養化現象，使得河川、湖泊缺氧，最後導致魚蝦大量死亡。

另外利用基因工程的方法減少動物飼料中植酸含量，提高對磷吸收效率，因而減少排泄物中磷對環境的污染，是世界各國未來之趨勢，是故日後亦將間接影響有機質肥料品質。謹此就近年來高效能植酸酵素作爲飼料添加物及低植酸含量飼料研發情形及期後對有機質肥料品質影響作一說明：

1. 高效能植酸酵素：

過去高效能植酸酵素大多由基因工程改良菌株產生，根據 Cromwell et al.,1993 年研究指出，飼料中添加植酸酵素餵食豬隻，其對磷之利用率由 15%增至 43%；另 Kornegay 1996 年亦發現肉雞飼料中添加植酸酵素，肉雞磷排泄量減少 24%。目前中央研究院余淑美博士研究室正利用基因工程的方法，將高效能植酸酵素基因轉殖至水稻及甘藷，以大量生產高效能植酸酵素作爲飼料添加物，以降低生產成本。

2. 低植酸含量飼料玉米

動物飼物含高量植酸不利於動物養分吸收利用，美國 Victor A. Raboy,1997 年曾利用突變技術研發低植酸含量玉米，該植酸含量遠

低於原野生種 66%，但仍具有高量無機磷，有利動物對飼料中磷素吸收利用。

3.高效能植酸酵素和低植酸含量玉米之應用對日後有機質肥料品質之影響

飼料中添加高效能植酸酵素，可促進飼料中植酸水解成爲無機磷供動物吸收利用，不必另外再添加無機磷並減少植酸和蛋白質結合，使得蛋白質消化率增加，如此也減少了氮肥排出量；而低植酸含量飼料玉米亦具異曲同功之效，即可以減少動物排泄物中磷素過高，改善目前有機質肥料施用量依氮素需求估算造成土壤磷素過高之現象。

結　語

土壤中磷素有效性低，故如何增進土壤中磷素有效性，過去即引起廣泛研究，不過多偏重土壤無機磷方面，然土壤有機磷在磷循環亦扮演著重要角色，而政府自八十四年起積極發展有機農業，在施肥管理方面，倡導不施化學肥料或減少化學肥料使用，以有機質肥料取代化學肥料，而有機質肥料原始資材大取自豬、家禽排泄物，該廢棄物中含有豐富植酸。除此，水旱田輪作制度爲土壤地力增進之重要對策，而穀類、豆科爲常見之輪作作物，此類作物含豐富植酸。而植酸是土壤有機磷之主要成分，唯需賴植酸酵素水解作用釋出無機磷方可供作物吸收利用，故利用高效能植酸酵素增進酸、中性土壤有機磷有效性，當爲可行。因此，期能利用基因改良之工程菌株生產高效能植酸酵素，研發生物肥料取代部份化學肥料施用，以增進土壤有機磷有效性。

有機質肥料的施用不但可提供作物生長所需之養分，改善土壤理化性質及微生物活性，更可解決本省大量農牧廢棄物造成之環境污染問題。而豬、家禽排泄物以及米糠含有豐富植酸，利用基因工程改良耐熱菌株生產之高效能植酸酵素當可促進植酸水解，增進磷素有效性，適用生產高磷有機質肥料。

另外，近年來利用基因工程的方法，減少動物飼料中高植酸含量造成環境磷污染問題，是世界各國未來之趨勢，其中高效能植酸酵素作爲飼料添加物及低植酸含量飼料玉米，可以有效減少動物排泄物中磷素過高，改善目前有機質肥料施用量依氮素需求估算，造成土壤磷素過高之缺失。因此，我們期能提升有機質肥料品質及多元化，使得有機質肥料製造及應用更臻完善。

參考文獻

1. 馬清華。1989。台灣土壤磷模式基礎資料之建立。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
2. 曾雅秀、方繼。1998 *pencillium simplicissimum* W46 胞外植酸酉每之生產、純化及特性分析。中國農業化學會誌 36:598-611。
3. 楊秋忠。1993。土壤與肥料(第五版)。農世股份有限公司，台中。
4. Cosgrove, D.J. 1970. Inositol phosphate phosphatases of microbial origin. Inositol phosphate intermediates in the dephosphorylation of myo-inositol, scyllo-inositol, and D-chiro-inositol by bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. Aust. J. Biol. Sci. 23:1207-1220.
5. Condron, L. M., K. M. Goh, and R. H. Newman. 1985. Nature and distribution of soil phosphorus as revealed by a sequential extraction method followed by ^{31}P nuclear magnetic resonance analysis. J. Soil Sci. 36:199-207.
6. Cromwell, G. L., T. S. Stahly, R. D. Coffey, H. J. Moneque, and J. H. Randolph. 1993. Efficacy of phytase in improving the bioavailability of phosphorus in soybean meal and corn-soybean meal diets for pigs J. Anim. Sci.71:1831-1840.
7. Dalal, R. C. 1977. Soil organic phosphorus. Adv. Agron. 29:83-117.
8. Ertl D. S., K. A. Young, and V.Raboy. 1998. Plant genetic approaches to phosphorus management in agricultural production. J. Environ. Qual. 27:299-304.
9. Findenegg, G. R. and Nelemans J. A. 1993. The effect of phytase on the availability of P from myo-inositol hexaphosphate (phytate) for maize roots. Plant and Soil. 154:189-196.
10. Greaves, M.P. Anderson, G. and Webley, D.M. 1967. The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. Biochem. Biophys. Acta, 132:412-418.
11. Greenwood, A. J. and Lewis, D. H. 1997. Phosphatase and the utilisation of inositol phosphate by *Aerobacter aerogenes*.

Biochim. Biophys. Acta,132: 412-418.

12. Harrison A. F. 1987. Soil organic phosphorus. C.A.B International.

13. Islam, A. and B. Ahmed, 1973. Distribution of inositol phosphate, phospholipids and nucleic acids and mineralization of phosphates in some Bangladesh. J. Soil Sci. 24:193-198.

14. Janne kerovuo, Marko Lauraeus, Paivi Nurminen, Nisse Kalkkinen, and Juha Apajalahti. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of novel phytase from *bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology 64(6):2079-2085.

15. Kornegay, E.T., D. M. Denbow, Z. Yi and V. Ravindran. 1996. Response of broilers to graded levels of microbial phytase added to maize-soyabean-meal-based diets containing three levels of non-phytate phosphorus. B. J.Nutr. 75:839-852.

16. Kasim A. B. and H. M. Edwards Jr. 1998. The analysis for inositol Phosphate forms in feed ingredients. J. Sci.food Agric. 76:1-9.

17. Liu, B. L., Amjad Rafig., Yew-Min Tzeng, and Abdul Rob 1998 The induction and characterization of phytase and beyond. Enzyme and Microbial Technology 22:415- 424.

18. Peperzak, P., A. G. Galdwell, R. R. Hunziker and Black, C. A. 1959. Phosphorus fractions in manures. Soil Sci. 87: 293-302.

19. Paul, E.A. and F.E. Clark. 1989. Soil microbiology and biochemistry.Academic Press, New York. P.222-232.

20. Richardson, A.E., and P. A. Hadobas.1997. Soil isolates of *pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphate. Can. J. Microbiol. 43 : 509-516.

21. Stewart B. A. 1991. Chemistry of phosphorus transformations in soil. Springer-Verlag New York Inc.16.

22. Shimizu, M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. Biosci. Biotechnol. Bio-chem.58:1266-1269.

23. Ullah, A. H., and D. M. Gibson. 1987. Extracellular phytase

(E.C.3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3155: Purication and characterization. Prep. Biochem .17:63-91.

24. Ullah, A. H., and R. J. Wodzinski. 1996. Phytase. Adv. Appl. Microbiol. 42 : 263-302.